

# 第一種使用規程承認申請書

令和3年11月15日

厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

氏名 中外製薬株式会社  
申請者 代表取締役社長 奥田 修  
住所 東京都北区浮間五丁目5番1号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項（同法第9条第4項において準用する場合を含む。）の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	<i>rep</i> 及び <i>cap</i> 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス 3B 型に由来する改変型キャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス 2 型に由来する ITR を有し、B ドメイン欠失型ヒト血液凝固第 VIII 因子を発現する非増殖性遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス（dirloctocogene samoparvovec）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄、並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	<b>本遺伝子組換え生物等の原液の保管</b> (1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等である旨を表示し、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。

	<p><b>本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管</b></p> <p>(2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</p> <p>(3) 希釈液は、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。</p> <p><b>運搬</b></p> <p>(4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。</p> <p><b>患者への投与</b></p> <p>(5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、患者の静脈内に投与することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。</p> <p><b>投与後の患者からの排出等の管理</b></p> <p>(6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間、対策を講じる。</p> <p>(7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。</p> <p>(8) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留めるために、排出等の管理が不要となるまでの期間、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を</p>
--	---

	<p>行う。</p> <p>(9) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、患者からの本遺伝子組換え生物等を含む排泄物等の環境への放出を最小限に留めるよう本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者に適切な指導を行う。</p> <p>(10) 本遺伝子組換え生物等の投与後、原則、排出等の管理が不要となるまでの期間、患者が外部医療施設での治療を受けることを避けるよう、患者に適切な指導を行う。</p> <p>(11) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、尿、血液、唾液及び精液検体について、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。</p> <p><b>患者検体の取扱い</b></p> <p>(12) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。</p> <p>(13) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査を外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託する場合、検体は本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。</p> <p>(14) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和45年法律第137号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。</p> <p><b>感染性廃棄物等の処理</b></p> <p>(15) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不</p>
--	---

	<p>活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。</p> <p>(16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。</p> <p>(17) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律施行令（昭和 46 年政令第 300 号）の別表第 1 の 4 の項に定める感染性廃棄物（以下「感染性廃棄物」という。）として廃棄する。運搬は、第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え生物等を含む廃棄物である旨を情報提供して行う。</p> <p>(18) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び検体は漏出しない容器に入れ、本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材は、二重袋等に厳重に封じ込めた状態で感染性廃棄物処理業者へ運搬し、感染性廃棄物として廃棄する。</p> <p>(19) 治療施設外で保管された未開封の本遺伝子組換え生物等を廃棄する場合は、密封された状態で高圧蒸気滅菌又は焼却処理を行い、廃棄する。</p>
--	---

## 1. 生物多様性影響評価書

### I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### 1. 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

*rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失し、アデノ随伴ウイルス 3B 型に由来する改変型キャプシドタンパク質及びアデノ随伴ウイルス 2 型に由来する ITR を有し、B ドメイン欠失型ヒト血液凝固第 VIII 因子を発現する非増殖性遺伝子組換えアデノ随伴ウイルス (*dirloctocogene samoparvovec*、以下「本遺伝子組換え生物等」という。) の宿主は、パルボウイルス科 (*Parvoviridae*) パルボウイルス亜科 (*Parvovirinae*) デペンドウイルス属 (*Dependovirus*) に属するヒトアデノ随伴ウイルス (*adeno-associated virus*) (以下「AAV」という。) と呼ばれるウイルスの一つである (文献 1、文献 2)。

AAV の主な血清型 (AAV2、AAV5 等) では、小児期の感染により、成人の約半数が中和抗体を有するとされるが、ヒトへの病原性を有する AAV の報告はない。

AAV 自体は、自己複製機能を欠損しており、動物細胞における複製は、アデノウイルス等のヘルパーウイルスの機能に依存するため、ヘルパーウイルスと同時に見いだされることが多い。

本遺伝子組換え生物等のゲノムの一部は、AAV2 に由来し、キャプシドタンパク質は、天然に存在する AAV キャプシド遺伝子 (AAV1、2、3B、4、6、8、9 型、トリ AAV 及びウシ AAV) を DNA シャッフリングすることで構築されたライブラリから、初代ヒト肝細胞が部分的に移植された肝臓をもつ *Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup>* (FRG) マウスを用いて *in vivo* で選別された改変型 *cap* 遺伝子に由来する (文献 3)。

自然環境及び実験室内において、ヒト以外の動物での AAV の増殖は報告されていない。

文献 1 : Condit RC. Principles of virology. In “Kaipe DM, Howley PM eds, Fields VIROLOGY 6th ed”. pp21-51. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia (2013)

文献 2 : International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2015)

文献 3 : Lisowski, L., Dane, A. P., Chu, K., Zhang, Y., Cunningham, S. C., Wilson, E. M., ... & Kay, M. A. (2014). Selection and evaluation of clinically relevant AAV variants in a xenograft liver model. *Nature*, 506(7488), 382-386.

2. 使用等の歴史及び現状（人用若しくは動物用医薬品としての利用の歴史又は産業的な利用の歴史及び現状を含む）

遺伝子組換え AAV（以下「組換え AAV」という。）は、さまざまなヒト疾患を治療することを目的とした遺伝子治療用ベクターとして世界的に汎用されている（文献 4）。組換え AAV2 は、臨床試験で最も使用されている。最近では、AAV8 や AAV9 などの血清型も利用頻度が増えてきている。組換え AAV を利用した最初のヒト遺伝子治療製品である Glybera（alipogene tiparvovec；組換え AAV1）は、家族性リポタンパク質リパーゼ欠損症を対象として 2012 年に欧州医薬品庁により承認された（2017 年に販売終了；文献 5）。その後、両アレル性 RPE65 変異を伴う網膜ジストロフィー（レーバー先天性黒内障）を対象としたヒト遺伝子治療製品である Luxturna（voretigene neparvovec；組換え AAV2）が 2017 年に米国食品医薬品局により承認され、2018 年には欧州医薬品庁で承認された（文献 6）。さらに、脊髄性筋萎縮症を対象としたヒト遺伝子治療製品である Zolgensma（onasemnogene abeparvovec；組換え AAV9）が、2019 年に米国食品医薬品局により承認され、国内でも令和 2 年 3 月 19 日に販売名「ゾルゲンスマ点滴静注」（製造販売承認番号：30200FZX00001000）として厚生労働省による製造販売承認を受けた（文献 7）。現時点では、ゾルゲンスマ点滴静注が国内における唯一の組換え AAV を利用したヒト遺伝子治療製品の承認品目である。

文献 4 : Wang, D., Tai, P. W., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature reviews Drug discovery*, 18(5), 358-378.

文献 5 : a) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). “Glybera” assessment report. 2012.  
b) CHMP, EMA. “Glybera” product information. 2017.

文献 6 : Spark Therapeutics. “Luxturna” Prescribing Information. 2017.

文献 7： 令和元年度承認品目一覧（再生医療等製品）

<https://www.pmda.go.jp/files/000235215.pdf>

### 3. 生理学的及び生態学的特性

#### (1) 基本的特性

野生型 AAV のウイルス粒子は、直径約 25 nm の正二十面体構造のキャプシドを有しており、エンベロープは有さない。AAV のゲノムは約 4.7 kb の線状一本鎖 DNA であり（文献 4）、プラス（センス）鎖 DNA を持つウイルス、マイナス（アンチセンス）鎖 DNA を持つウイルス共に感染性を有する。AAV ゲノムの両端には、DNA 複製、パッケージング、宿主細胞ゲノムへの組み込み及びその後の切り出しに必要な配列を含む T 字型の逆位末端反復配列（以下「ITR」という。）があり、その間に DNA の複製に必要な 4 つの Rep タンパク質（Rep78、Rep68、Rep52 及び Rep40）をコードする *rep* 遺伝子及び AAV の正二十面体キャプシドを形成する 3 つのキャプシドタンパク質（VP1、VP2 及び VP3）をコードする *cap* 遺伝子が挟まれている（文献 4、文献 8）。AAV には、キャプシドタンパク質のアミノ酸配列の違いによって 100 以上の型があり、それぞれ感染指向性が異なる。多くの AAV には共通する受容体（以下「AAVR」という。）があることが知られているが（文献 9）、感染には血清型ごとに異なる副受容体（以下「副受容体」という。）も関与しており、これらの組み合わせによって指向性の違いが生ずると考えられている（文献 10）。

AAV のゲノム構造を別紙 1 に示す（文献 8）。

#### (2) 生育又は生育可能な環境の条件

細胞に感染した野生型 AAV が核内に侵入すると、キャプシドからウイルスゲノムが細胞質へ放出され、その後ウイルスゲノムは核内で安定した二本鎖環状 DNA（以下「エピソーム」という。）として存在するか、Rep タンパク質の関与により第 19 染色体長腕の AAVS1 領域への組み込みが起こる。一般的な組換え AAV では、*rep* 遺伝子を欠失しているため、染色体への部位特異的組み込みは起こらない。組換え AAV の細胞染色体へのランダムな組み込みは低頻度で起こりうる。また、活発に転写されている遺伝子領域に挿入

されやすいとの報告がある（文献 11）。

AAV が細胞に単独感染した場合は、自律的な増殖ができず、エピソードとして又は染色体へ組み込まれた状態で潜伏感染する。一方で、アデノウイルスやヘルペスウイルス等のヘルパーウイルス（以下「ヘルパーウイルス」という。）が共存する場合は、これらの *E1A*、*E1B*、*E2A*、*E4* 及び *VA* 遺伝子機能を利用して、AAV ゲノムの複製とウイルス粒子の構成が起こる。培養細胞でも同様にヘルパーウイルスの感染が成立する場合にのみ増殖が起こる。

細胞外に放出された AAV は常温において安定である。

### (3) 捕食性又は寄生性

AAV が他の生物を捕食することはない。野生型 AAV が哺乳動物に感染することは知られているが、血清型や系統によって感染宿主域は異なる（文献 10）。自然界においてヒト以外で増殖を伴う感染が起こるかどうかは明らかでない。

ヒトより AAV2、AAV3、AAV5、AAV6 が、非ヒト霊長類より AAV1、AAV4、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11 が同定されている。ほとんどの AAV のキャプシドタンパク質はどれも構造的に類似しており、AAV2 のキャプシドのアミノ酸配列に対して 80～88%の相同性、DNA 配列で 78～82%の相同性を有する。

AAV は血清型や系統に応じて、特異性の高い臓器が異なることが知られている（文献 12）。本遺伝子組換え生物等は、その改変型キャプシドの特性からヒト肝細胞に特異性が高いことが報告されている（文献 3）。

### (4) 繁殖又は増殖の様式

野生型 AAV のヒトへの感染経路として、経気道感染、糞口感染及び接触感染が挙げられている（文献 13）。感染の際には、AAV は、AAVR 及び副受容体を介したエンドサイトーシスにより取り込まれる。細胞内侵入後は、エンドソーム内の弱酸性環境下で細胞質に放出されて核周囲に蓄積し、さらに核膜孔複合体を通して核内に移行すると考えられている。この時、ヘルパーウイルスが同時に感染している場合、AAV は感染細胞及び感染個体で増幅し、ヘルパーウイルスと共に分泌物と一緒に排泄され、次の生物に感染す

る。ヘルパーウイルスが共存しない場合は、AAV のゲノムは感染細胞において複製することなく、エピソームとして核内に潜伏するが、稀に染色体に組み込まれることがある（文献 14、文献 15）。

AAV の感染様式及び生活環、並びに組換え AAV による遺伝子導入経路を別紙 2 に示す（文献 4、文献 8）。

#### (5) 病原性

野生型 AAV の感染は不顕性に終わると考えられており、これまで野生型 AAV の感染に伴う病原性は知られていない（文献 4、文献 10）。

なお、野生型 AAV2 の染色体への組み込みと肝がん発症との関連を示唆する報告があるが、これまでに AAV を用いて実施された臨床試験において肝がんの発症は確認されていない（文献 16）。

#### (6) 有害物質の産生性

野生型 AAV の感染に際して細胞内で産生されるタンパク質が病原性又は毒性を示すという報告はない。

#### (7) その他の情報（不活化条件等を含む）

AAV は、一般的なパルボウイルスと同様に、物理化学的に安定なキャプシドを有し、エンベロープを持たないため、物理化学的に比較的堅牢で、乾燥に抵抗性があり、常温において安定している。

不活化には加熱（85℃、数分間）、次亜塩素酸ナトリウム（1,000 ppm）、水酸化ナトリウム、紫外線（UV）照射などの処理が必要とされている（文献 1）。また、通常のオートクレーブ処理（121℃、20 分間）により完全に不活化される。

その他の不活化方法

- 170℃、2 時間の乾熱滅菌
- 20～30 分間の煮沸消毒
- 3.5～4%ホルマリン

- 2%グルタラル
- 10%又は1%ポピドンヨード液、0.3%過酸化水素水

- 文献 8 : Balakrishnan, B., & R Jayandharan, G. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Current gene therapy*, 14(2), 86-100.
- 文献 9 : Pillay, S., Meyer, N. L., Puschnik, A. S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, Y. A., ... & Carette, J. E. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*, 530(7588), 108-112.
- 文献 10 : Srivastava, A. (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Current opinion in virology*, 21, 75-80.
- 文献 11 : Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T. A., Grompe, M., & Kay, M. A. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nature genetics*, 34(3), 297-302.
- 文献 12 : 伴野太郎, 岡田浩典, & 岡田尚巳. (2015). 遺伝子導入用ウイルスベクターの特徴と作製法. *Pharma Medica*, 33(4), 15.
- 文献 13 : Geoffroy, M. C., & Salvetti, A. (2005). Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. *Current gene therapy*, 5(3), 265-271.
- 文献 14 : Schnepf, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A., & Johnson, P. R. (2003). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *Journal of virology*, 77(6), 3495-3504.
- 文献 15 : Grimm, D., Pandey, K., Nakai, H., Storm, T. A., & Kay, M. A. (2006). Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *Journal of virology*, 80(1), 426-439.
- 文献 16 : Srivastava, A., & Carter, B. J. (2017). AAV infection: protection from cancer. *Human gene therapy*, 28(4), 323-327.





- ITR

一般的に AAV ゲノムの 5' 及び 3' 末端領域は ITR として知られている。野生型 AAV2 のコード領域及び ITR 配列を有するプラスミド pSub201 からクローニングして得られた。

(2) 構成要素の機能

本遺伝子組換え生物等の供与核酸の構成要素の機能は以下のとおりである。

- coBDD-hFVIII<sup>8Q</sup> 遺伝子をコードする領域

ヒト血液凝固第 VIII 因子は、分子量 300 kDa の糖タンパク質として合成される。この 300 kDa のタンパク質は活性を持たない前駆体タンパク質であり、A1-A2-B-A3-C1-C2 の 6 つの構造的ドメインから構成されている。活性化の過程において、Ser741 から Arg1648 までに相当する B ドメインは Arg740 と Arg1648 でトロンビン等による切断を受けることで除去される。coBDD-hFVIII<sup>8Q</sup> 遺伝子をコードする cDNA は、野生型ヒト血液凝固第 VIII 因子 cDNA から Gln744 から Ser1637 をコードする領域を除去して Ser743 と Gln1638 を繋げることで設計された (文献 17)。上述の 2 ヶ所のトロンビン切断部位を含む BDD-hFVIII が効率よく 2 本のペプチド鎖に切断され活性化されることが報告されている。

- ██████████ プロモーター

██████████ プロモーターはマウス (*Mus musculus*) の ██████████ ██████████ 遺伝子に由来する。██████████ (文献 21)。██████████ プロモーターは ██████████

遺伝子から、脈絡叢上皮細胞での遺伝子発現を誘導しない、肝細胞特異的エンハンサー/プロモーター配列として単離された ██████████ bp の長さの配列である (文献 19)。

- ██████████ 由来合成イントロン

██████████ 由来合成イントロンは、mRNA の安定化によって、導入遺伝子の発現増加に寄与する。

- ウサギβグロビン遺伝子ポリアデニル化シグナル

ウサギβグロビン遺伝子ポリアデニル化シグナルは mRNA の安定化に寄与する。

- ITR

ITR は、本遺伝子組換え生物等の製造において、粒子中にウイルスゲノムをパッケージするために必要である。また、標的細胞への導入の後、ウイルスゲノムの安定化に ITR が必要となる。ITR は、宿主のポリメラーゼによる不安定な一本鎖 DNA から安定した二本鎖 DNA の形成の起点となる。また、ITR は繰り返し構造であるため、複数のウイルスゲノムの ITR と ITR が複合化し、線状多量体（以下「コンカテマー」という。）として知られるより大きな二本鎖 DNA を形成する。このコンカテマーは転写活性を保持しており、持続的に安定なエピソーム構造を有する（文献 14）。なお、ITR はタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）を有していない。

これらの供与核酸について、アメリカ国立生物工学情報センター（NCBI）のデータベースを用いて相同性検索を行った結果、毒素、がん原性等の有害性を有する可能性のある塩基配列は認められなかった。また、遺伝子操作により目的外の ORF が生じることで産生されるタンパク質は特定されなかった（別紙 3）。

文献 17： Lind, P., Larsson, K., Spira, J., Sydow - Bäckman, M., Almstedt, A., Gray, E., & Sandberg, H. (1995). Novel forms of B - domain - deleted recombinant factor VIII molecules: construction and biochemical characterization. *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 19-27.

文献 18：

[Redacted text]

文献 19：

[Redacted text]

文献 20 : Levitt, N., Briggs, D., Gil, A., & Proudfoot, N. J. (1989). Definition of an efficient synthetic poly (A) site. *Genes & development*, 3(7), 1019-1025.

文献 21 : [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

2. ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来  
該当なし。

(2) 特性  
該当なし。

3. 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

本遺伝子組換え生物等のゲノム及び発現される BDD-hFVIII の構成を別紙 3 に示す。本遺伝子組換え生物等のゲノムは、*coBDD-hFVIII<sup>SO</sup>* 遺伝子発現カセット及びその両側の野生型 AAV2 のウイルスゲノム由来 ITR からなる。*coBDD-hFVIII<sup>SO</sup>* 遺伝子発現カセットは、[REDACTED] プロモーター、[REDACTED] 由来合成イントロン、*coBDD-hFVIII<sup>SO</sup>* 遺伝子コード配列、ウサギ β グロビン遺伝子ポリアデニル化シグナル及び制限酵素切断部位に由来する人工配列からなる。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法

本遺伝子組換え生物等は、以下の供与核酸を搭載したプラスミド [REDACTED]、AAV2 に由来する *rep* 遺伝子及び AAV3B に由来する改変型 *cap* 遺伝子を搭載したプラスミド [REDACTED] パッケージングプラスミド) 及び [REDACTED] (ヘルパープラスミド) をヒト胎児腎細胞 293 (以下「HEK293 細胞」という。) に同時にトランスフェクションすることで作製される。

- [REDACTED]  
[REDACTED] プロモーター、 [REDACTED] [REDACTED] 由来合成イントロン、*coBDD-hFVIII<sup>SO</sup>* 遺伝子をコードする領域、AAV2 に由来する ITR 等を搭載するプラスミド
- [REDACTED]  
AAV2 に由来する *rep* 遺伝子及び AAV3B に由来する改変型 *cap* 遺伝子（文献 3）を搭載するプラスミド
- [REDACTED]  
アデノウイルス 2 型の *E2A*、*E4* 及び *VA* 領域を搭載するプラスミド

### (3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本遺伝子組換え生物等は、米国の製造施設において製造される。

本遺伝子組換え生物等の製造工程の概略は以下のとおりである。

解凍したセルバンクを培養して得られた HEK293 細胞に、 [REDACTED]、 [REDACTED] 及び [REDACTED] を同時にトランスフェクションして培養後、細胞を溶解し、清澄化した液からウイルス粒子を精製し、濃縮後透析ろ過して原薬を得る。凍結保管された原薬を融解し、無菌ろ過後に容器に充填して本遺伝子組換え生物等の製剤を得る。得られた本遺伝子組換え生物等について、品質管理試験を実施する。

なお、増殖能を獲得したウイルス（replication-competent AAV、以下「rcAAV」という。）は、将来的に原薬又は製剤の規格試験において管理する予定である（別紙 6）。

本遺伝子組換え生物等の育成の経過の詳細を別紙 4、別紙 5 及び別紙 6 に示す。

### 4. 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入された核酸は、本遺伝子組換え生物等の一本鎖 DNA ゲノムの一部として存在し、凍結保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染方法が保管中に変化することはない（文献 22）。

動物細胞に感染すると、本遺伝子組換え生物等のゲノムは核内に移行して二本鎖 DNA となり、多くは染色体とは独立したエピソームとして存在すると考えられる（文献 14、

文献 15、文献 23)。このエピソームから *coBDD-hFVIII<sup>SO</sup>* 遺伝子が転写される。細胞のゲノムへの組み込みは稀で、低頻度である。BDD-hFVIII の発現は、発現する細胞の遺伝子に変化が起こらないかぎり継続するものと考えられる。

本遺伝子組換え生物等を HEK293 細胞で作製する過程で rcAAV を生ずる可能性は否定できない。しかし、その rcAAV は、AAV のウイルス粒子にパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すれば、ほぼ全ての供与核酸を失っている可能性が高いと考えられる。さらに、この rcAAV も野生型 AAV と同様にヘルパーウイルスの共存がないかぎり実際には増殖することは不可能である。

文献 22 : Xu, R., Rahimi, M., Ma, H., Fung, P., Chang, C., Xu, S., & During, M. (2005). Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery. *Medical science monitor*, 11(9), BR305-BR308.

文献 23 : Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y., & Engelhardt, J. F. (2005). Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *Journal of virology*, 79(1), 364-379.

## 5. 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

### <非臨床試験>

定量的ポリメラーゼ連鎖反応法（以下「qPCR 法」という。）により本遺伝子組換え生物等の DNA の検出及び定量を行った。動物からの採取検体から市販の DNA 抽出・精製キットによって AAV ゲノムを抽出し、qPCR 法の検体として用いた。

本遺伝子組換え生物等は宿主の AAV に存在しない *coBDD-hFVIII<sup>SO</sup>* 遺伝子及びその発現カセットをコードしているため、その配列の一部をポリメラーゼ連鎖反応で特異的に増幅、定量することが可能である。██████████試験における qPCR 法の検出限界及び定量下限は、██████████である。

また、ウサギを用いた、本遺伝子組換え生物等と同じ改変型キャプシドからなりヒト血液凝固第 IX 因子（以下「hFIX」という。）を発現する本遺伝子組換え生物等類似の組換え AAV の生殖細胞系列伝播評価試験では、hFIX 遺伝子配列の一部をポリメラーゼ連鎖反応で特異的に増幅し定量した。本 qPCR 法の検出限界及び定量下限は、██████████



性高くヒト肝細胞に形質導入することが示唆されている。また、AAV2 及び AAV3B と比較して静注用免疫グロブリンに対する高い耐性を示す。

- 本遺伝子組換え生物等は、ゲノムの複製やウイルス粒子の形成に必要な *rep* 及び *cap* 遺伝子を欠失しているため、その生存力は野生型 AAV 以下である。本遺伝子組換え生物等の増殖が起こるのは、*rep* 及び *cap* 遺伝子が組み込まれた又はトランスフェクションされた細胞にヘルパーウイルスと共感染した場合、若しくは通常の細胞に本遺伝子組換え生物等、野生型 AAV、及びヘルパーウイルスが三重に共感染した場合のみである。本遺伝子組換え生物等の感染する動植物の種類、感染経路、伝播様式等は野生型 AAV と同等と考えられるが、感染してもそのゲノムの大半は染色体に組み込まれず、主に核内の染色体外にエピソームとして存在する。
- 本遺伝子組換え生物等の作製時、AAV2 に由来する *rep* 遺伝子及び AAV3B に由来する改変型 *cap* 遺伝子をもつ [REDACTED] と *coBDD-hFVIII<sup>8Q</sup>* 遺伝子をもつ [REDACTED] 間での遺伝子組換えにより本遺伝子組換え生物等由来の rcAAV が生じる可能性がある。この場合でも、ウイルスゲノムの複製に必須な ITR と *rep* 遺伝子、及び細胞指向性を規定するキャプシドの主要部分は野生型と同一であるので、本遺伝子組換え生物等に該当するものも含め、rcAAV のヒトや動植物等への感染性、感染方法、病原性など、生物多様性に影響を与える性質は野生型 AAV と同等であると考えられる。また供与核酸の一部を保持した rcAAV が生じる可能性は否定できないが、AAV 粒子中にパッケージング可能なゲノムの長さは非常に短いため、供与核酸を保持したとしてもその長さは極めて短いと考えられる（文献 14、文献 15）。

### Ⅲ 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### 1. 使用等の内容

ヒトの遺伝子治療を目的とした投与、保管、運搬及び廃棄、並びにこれらに付随する行為

#### 2. 使用等の方法

本遺伝子組換え生物等の原液の保管

- (1) 本遺伝子組換え生物等の原液は、容器に密封された状態で遺伝子組換え生物等であることを表示し、治療施設内の適切に管理された冷凍庫において保管する。

本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製及び保管

- (2) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液の調製は、治療施設の他の区画と明確に区別された作業室内で行い、作業室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

- (3) 希釈液は、容器に入れ、漏出しない状態で保管する。

運搬

- (4) 本遺伝子組換え生物等の治療施設内での運搬は、漏出させない措置を執って行う。

患者への投与

- (5) 本遺伝子組換え生物等の投与は、治療施設の他の区画と明確に区別された治療室内で、患者の静脈内に投与することにより行う。投与時は、治療室内での本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留める。

投与後の患者からの排出等の管理

- (6) 投与後、患者の投与部位を消毒し、投与部位から排出される本遺伝子組換え生物等の環境への拡散が最小限となるよう、医師の判断により必要とされる期間、対策を講じる。
- (7) 患者の排出物等から第三者への本遺伝子組換え生物等の伝播を最小限とするために、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。
- (8) 投与を受けた患者が当該治療施設以外の医療施設（以下「外部医療施設」という。）で治療を受ける場合には、本遺伝子組換え生物等の拡散を最小限に留めるために、排出等の管理が不要となるまでの期間、外部医療施設に対し第一種使用等の承認を受

けた遺伝子組換え生物等が投与された患者であることが情報提供されるよう、本遺伝子組換え生物等の投与を受ける患者に適切な指導を行う。

- (9) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、患者からの本遺伝子組換え生物等を含む排泄物等の環境への放出を最小限に留めるよう本遺伝子組換え生物等の投与を受けた患者に適切な指導を行う。
- (10) 本遺伝子組換え生物等の投与後、原則、排出等の管理が不要となるまでの期間、患者が外部医療施設での治療を受けることを避けるよう、患者に適切な指導を行う。
- (11) 投与された本遺伝子組換え生物等の排出等の挙動が明らかになるまで、尿、血液、唾液及び精液検体について、本遺伝子組換え生物等の排出等の検査を経時的に実施する。

#### 患者検体の取扱い

- (12) 患者から採取した検体（以下「検体」という。）は、治療施設及び外部医療施設（以下「施設等」という。）の規定に従って取り扱う。
- (13) 本遺伝子組換え生物等の投与後、排出等の管理が不要となるまでの期間、検体の検査を外部の受託検査機関（以下「検査機関」という。）に委託する場合、検体は本遺伝子組換え生物等が漏出しない容器に入れ、施設等から検査機関へ運搬する。検体は検査機関の規定に従って取り扱う。
- (14) 検体の廃棄は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律（昭和 45 年法律第 137 号）に基づいて施設等又は検査機関で定められた医療廃棄物の管理に係る規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従って行う。

#### 感染性廃棄物等の処理

- (15) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄は、治療施設内で不活化処理を行った上で、医療廃棄物管理規程に従って行う。
- (16) 本遺伝子組換え生物等の原液の希釈液及び本遺伝子組換え生物等が付着した可能性のある機器及び器材の廃棄は、医療廃棄物管理規程に従って行う。再利用する機器及び器材にあつては、不活化処理を行い、十分に洗浄する。
- (17) 本遺伝子組換え生物等の原液の廃棄を感染性廃棄物処理業者に委託する場合には、本遺伝子組換え生物等の原液は、漏出しない容器に入れた上で他の医療廃棄物と区別して保管し、感染性廃棄物処理業者へ運搬し、廃棄物の処理及び清掃に関する法律





#### GLP 試験

投与量： [REDACTED] (マウスの体重を 25g とすると、 [REDACTED] に相当する。)、投与方法：単回静脈内投与

本遺伝子組換え生物等の生体内分布は、上記のカニクイザルを用いた一般毒性試験 (GLP、投与量： [REDACTED]) の一部として評価されている。さらに、本遺伝子組換え生物等の生体内分布に関連する試験として、hFIX を発現する本遺伝子組換え生物等類似の組換え AAV をウサギに投与した以下の非臨床試験が行われている。

- hFIX を発現する本遺伝子組換え生物等類似の組換え AAV のウサギ生殖細胞系列伝播評価試験、非 GLP 試験

投与量： [REDACTED]、投与方法：単回静脈内投与

以下に生体内分布試験及び関連する非臨床試験で得られた結果の概要を示す。

- カニクイザルを用いた一般毒性試験

本試験では、27 の組織 [骨、骨髄、脳、盲腸、結腸、横隔膜、十二指腸、心臓、回腸、空腸、腎臓、肝臓 (4 葉)、肺、リンパ節 (肝臓、鼠径部、及び腸間膜) 脾臓、腰筋、皮膚、脾臓、胃、精巣、胸腺、及び膀胱] 及び 2 つの体液 (血液及び血清) について、投与後 [REDACTED] 目に本遺伝子組換え生物等の濃度を qPCR 法により定量した。これらの検体のうち、[REDACTED] において最も高濃度の本遺伝子組換え生物等が検出され、次いで [REDACTED] で高濃度の本遺伝子組換え生物等が検出された。一方で、高用量群においても、[REDACTED] 及び [REDACTED] での本遺伝子組換え生物等の濃度は極めて低く、[REDACTED] での濃度の  $1 \times 10^5$  分の 1 であった。

- hFIX を発現する本遺伝子組換え生物等類似の組換え AAV のウサギ生殖細胞系列伝播評価試験

本試験では、本遺伝子組換え生物等と同じ改変型キャプシド (AAV-Spark200) 及び、本遺伝子組換え生物等と異なる改変型キャプシド (AAV-Spark100) を比較するかわり、hFIX を発現する本遺伝子組換え生物等類似の組換え AAV をウサギに投与し、投与後 [REDACTED] までの期間 (投与前、投与後 [REDACTED] 目、[REDACTED] 目)





回) へと 99%有意に減少した (p 値<0.0001)。また、同集団の 80%の患者では、治療後 5 週目以降で無出血の状態が維持された。

当該臨床試験における当該組換え AAV の忍容性は良好で、1 名の被験者は追跡不能となったが、FVIII に対するインヒビター、又は血栓塞栓性イベントを発現した被験者はいなかった。最も高頻度に認められた有害事象は、肝機能の臨床検査であるアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 上昇で、86% (115 例) の被験者に認められた。その他の主な有害事象は、頭痛 38% (51 例)、悪心 37% (50 例)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 上昇 35% (47 例)、関節痛 28% (38 例) 及び疲労 27% (37 例) であった。計 43 件の重篤な有害事象 (SAE) が被験者の 16.4% (22 例) に発現したが、全て消失した。

全体として、当該組換え AAV の安全性プロファイルは第 I/II 相臨床試験で報告されたデータと一致しており、遅発性の治療関連事象は認められなかった。FVIII インヒビターが出現した被験者や試験を中止した被験者、血栓性イベントを発症した被験者はいなかった。当該組換え AAV に関連する主な有害事象は早期に発現し、一過性の注入に伴う事象及び無症候性の肝機能検査で測定した特定のタンパク質及び酵素のレベルの軽度から中等度の上昇であり、臨床で長期にわたり続発するような事象は認められなかった。

また、当該組換え AAV のヒトでの排出については、以下のとおり報告されている (文献 25)。

重症血友病 A の成人男性被験者 15 例を対象に、 $6 \times 10^{12}$  vg/kg (n=1)、 $2 \times 10^{13}$  vg/kg (n=1)、 $4 \times 10^{13}$  vg/kg (n=6) 又は  $6 \times 10^{13}$  vg/kg (n=7) の当該組換え AAV を単回静脈内投与した第 I/II 相臨床試験、同じく重症血友病 A の成人男性被験者 134 例を対象に、 $6 \times 10^{13}$  vg/kg の当該組換え AAV を単回静脈内投与した第 III 相臨床試験において、血液、唾液、糞便、精液及び尿中のベクターDNA の測定を、バリテーション済みの qPCR 法を用いて実施した。サンプル (血液、唾液、尿、便及び精液) は、qPCR によるベクターDNA の測定で連続 3 回の陰性結果が得られるまで採取した。形質導入可能なベクターDNA を検出する目的で、血漿及び精液中の無傷の AAV5 ベクターキャプシドの量を測定するための新規免疫捕獲 qPCR (iqPCR) 法を開発し、当該組換え AAV ゲノムの隣接性と構造特性の評価を含む、ベクターDNA の血液中での生体内分布の更なる解析を、ドロップレットデジタル (dd) PCR アッセイにより、血液、血漿、末梢血単核細胞 (PBMC) 及び赤血

球で実施した。

当該組換え AAV の投与後、ベクターDNA は、全ての投与量、全ての被験者で、評価した全ての排出サンプル（血液、唾液、尿、便及び精液）で検出され、検出されたベクターDNA 濃度は、血液で最も高く、次いで唾液、精液、便、尿の順であった。ベクターDNA 濃度のピークは早期に観察され、ピークを越えて以降、当該組換え AAV ゲノムは尿、精液、唾液、便、血液から着実に除去された。形質導入可能なキャプシド化ベクターDNA を定量解析するために新たに開発した iqPCR を用いて測定した場合、従来の qPCR で測定した総ベクターDNA の場合と比較して、キャプシド化ベクターDNA は血漿及び精液中からより早く消失した。全血及び血液分画中の総ベクターDNA 量の解析では、ベクターDNA のクリアランスは三相性を示し、これは予測される形質導入細胞の寿命と関連すると考えられた。当該組換え AAV 投与の約 24 週以降、全血中のベクターDNA の緩慢な減少速度が観察され、血液中に 24 週を超えて存在する導入遺伝子の大部分は、PBMC 分画内に存在する可能性が高かった。

血液中のベクターDNA の更なる解析から、検出されるベクターDNA は初期の断片型から時間とともに完全長型に移行していることが示された。全血中で ITR 融合を含む DNA 分画が増加したことから、残存ベクターDNA が導入細胞内で環状エピソームを形成している可能性が示唆された。当該組換え AAV 投与後 52 週時点では、全血中のベクターDNA の大部分は ITR 融合を含む完全長型であった。当該組換え AAV は複製能を欠失しており、投与後の分泌物及び排泄物中のベクターDNA 濃度から想定される潜在的曝露量を踏まえると、治療を受けた患者以外の個人への伝播リスクは極めて低いと考えられた。

なお、当該組換え AAV を単回静脈内投与した第 I/II 相臨床試験の被験者 15 名から採取した血漿及び精液への当該組換え AAV の排出等を、形質導入可能なキャプシド化ベクターDNA 量を測定するために新たに開発した iqPCR 法で解析した結果については、以下のとおり報告されている（文献 26）。

当該組換え AAV の  $6 \times 10^{12}$ ~ $6 \times 10^{13}$  vg/kg 投与後、被験者 15 例全例の血漿及び精液中で当該組換え AAV が検出された。血漿中の当該組換え AAV 濃度のピークは投与直後に認められ、全被験者のピーク濃度到達時間の中央値は、血漿中及び精液中でそれぞれ 0.4 週及び 0.6 週であった。当該組換え AAV 濃度のピーク値の中央値は投与量に依存して増加した。 $6 \times 10^{12}$  vg/kg の当該組換え AAV を投与された 1 例の被験者における当該組換え

AAV 濃度のピークは、血漿中では定量限界未満であり、精液中では  $2.9 \times 10^5$  vg/mL であった。一方、 $6 \times 10^{13}$  vg/kg の当該組換え AAV を投与された 7 例の被験者における当該組換え AAV のピーク濃度の中央値は、血漿及び精液中でそれぞれ  $2.8 \times 10^8$  及び  $7.7 \times 10^5$  vg/mL であった。血漿及び精液中で、最終陽性となった時間の全被験者における中央値は、それぞれ 2.1 週及び 1.3 週であり、最初に 3 回連続陰性となるまでの時間の全被験者における中央値（最小値、最大値）は、それぞれ 3.1（2.5、9.0）週と 3.3（1.8、9.0）週であった。

<FVIII を発現するその他の組換え AAV>

本遺伝子組換え生物等類似のものを含め FVIII を発現する組換え AAV を用いた臨床試験の一覧を別紙 11 に示す。本遺伝子組換え生物等並びに上記の組換え AAV 以外の FVIII を発現するその他の組換え AAV の血友病 A を対象とした臨床試験における有効性や安全性の結果については今のところ予備的な情報に限られている（文献 27）。申請者らが調べた限りでは、本遺伝子組換え生物等類似の FVIII を発現する組換え AAV について、ヒトでの深刻な安全性上の問題や、第三者への高い伝播リスクを有するといった生物多様性に重大な影響を与えうる可能性を示唆する情報はなかった。

文献 25 : Clark A, Hammon K, Sandza K, et al. Vector Shedding and Blood Biodistribution in Patients with Severe Hemophilia a Following Administration of Valoctocogene Roxaparvovec, American Society of Hematology, 62th ASH Annual Meeting and Exposition 2020, Oral and Poster Abstracts 3366

文献 26 : Sandza K, Clark A, Koziol E, Akeefe H, Yang F, Holcomb J, Patton K, Hammon K, Mitchell N, Wong WY, Zoog SJ, Kim B, Henshaw J, Vettermann C. Ultra-sensitive AAV capsid detection by immunocapture-based qPCR following factor VIII gene transfer. Gene Ther. 2021 Aug 23. doi: 10.1038/s41434-021-00287-1. Online ahead of print.

文献 27 : Monahan, P. E., Négrier, C., Tarantino, M., Valentino, L. A., & Mingozi, F. (2021). Emerging Immunogenicity and Genotoxicity Considerations of Adeno-Associated Virus Vector Gene Therapy for Hemophilia. Journal of Clinical Medicine, 10(11), 2471.

## IV 生物多様性影響評価

### 1. 他の微生物を減少させる性質

#### (1) 影響を受ける可能性のある微生物の特定

野生型 AAV は、競合、有害物質の産生等により他の微生物を減少させることは知られていない。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失、供与核酸の導入、並びに AAV3B に由来する改変型キャプシドの他は野生型 AAV と本質的に同一である。これらの改変による野生型 AAV からの感染宿主域の変化はない。

したがって、本遺伝子組換え生物等及び rcAAV によって影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

該当せず。

#### (3) 影響の生じやすさの評価

該当せず。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、他の微生物を減少させる性質に基づいて、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 2. 病原性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失、供与核酸の導入、並びに AAV3B に由来する改変型キャプシドの他は野生型 AAV と本質的に同一である。これらの改変による野生型 AAV からの感染宿主域の変化はない。

## (2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失、供与核酸の導入、並びに AAV3B に由来する改変型キャプシドの他は野生型 AAV と本質的に同一であり、野生型 AAV と同様に、病原性を持つ可能性が低いと考えられる。

本遺伝子組換え生物等の感染により、感染細胞内で BDD-hFVIII が産生される。本遺伝子組換え生物等の感染により産生される BDD-hFVIII は、血友病 A 治療薬として海外で市販されている遺伝子組換え BDD-hFVIII 製品（一般名：moroctocog alfa、販売名：ReFacto<sup>®</sup> 及び Xyntha<sup>®</sup>）の有効成分と同一のアミノ酸配列を有する。産生された BDD-hFVIII は、血液の流れに乗って全身の血液に分布し、止血機構を維持する。BDD-hFVIII は、病原性があることは知られていない。また、本遺伝子組換え生物等の安全性を評価したマウスやカニクイザルの非臨床試験において、本遺伝子組換え生物等の投与に関連した毒性は認められていない。

また、AAV 粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、rcAAV は野生型 AAV と同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAV が病原性を持つことはないと考えられる。

なお、野生型 AAV2 の染色体への組み込みと肝がん発症との関連を示唆する報告があるが、これまでに AAV を用いて実施された臨床試験において肝がんの発症は確認されていない（文献 16）。

## (3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した本遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスが標的細胞に共感染しても増殖することなく、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAV が発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、増殖する可能性は極めて低い。

製造工程で生じうる rcAAV は、将来的に原薬又は製剤の規格試験で規格値を定めて管

理する。

したがって、本遺伝子組換え生物等及び rcAAV が第三者、野生動植物等に対して病原性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、病原性に起因した生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

### 3. 有害物質の産生性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失、供与核酸の導入、並びに AAV3B に由来する改変型キャプシドの他は野生型 AAV と本質的に同一である。これらの改変による野生型 AAV からの感染宿主域の変化はない。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

本遺伝子組換え生物等のキャプシドタンパク質に対する免疫応答は、野生型 AAV の免疫応答と同様に、自然界における感染と同等の量の曝露であれば無症候性であると考えられる。複数の臨床試験において、組換え AAV の大量投与によって重篤な免疫炎症反応等が報告されているが、ステロイド剤の投与等によって、これらの免疫炎症反応の発生の軽減が可能であると考えられている（文献 28、文献 29）。

AAV 粒子がパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すると、rcAAV は野生型 AAV と同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAV が有害物質の産生性を持つことはないと考えられる。

本遺伝子組換え生物等の感染により、その DNA が細胞の核に導入されると、導入遺伝子が転写及び翻訳され、BDD-hFVIII が産生されるが、その他に新たな有害物質が産生されることはない。本遺伝子組換え生物等により産生される BDD-hFVIII は、血友病 A 治療薬として海外で市販されている遺伝子組換え BDD-hFVIII 製品（一般名：moroctocog

alfa、販売名：ReFacto<sup>®</sup>及び Xyntha<sup>®</sup>) の有効成分と同一のアミノ酸配列を有する。BDD-hFVIII は、血液の流れに乗って全身に分布し、止血機構を維持する。遺伝子組換え BDD-hFVIII 製品 (一般名：moroctocog alfa、販売名：ReFacto<sup>®</sup>及び Xyntha<sup>®</sup>) の注意が必要な副作用として、過敏症、アレルギー反応、アナフィラキシーショック、FVIII に対するインヒビター (中和抗体) 産生などが示されている。また、その他にも、同製品の臨床使用上で比較的発現頻度が高い有害事象としては、FVIII に対するインヒビター、頭痛、せき、関節痛及び発熱が報告されている (文献 30)。

本遺伝子組換え生物等による BDD-hFVIII の発現は、██████████ プロモーターの制御により、自然界で FVIII が発現している肝臓 (肝細胞) に限定される。したがって、本遺伝子組換え生物等を介した BDD-hFVIII の発現に対する局所反応は生じないと考えられる。

カニクイザルに本遺伝子組換え生物等を ██████████ ██████████ (第 III 相臨床試験の予定される最大用量 ██████████ のそれぞれ █ 倍、█ 倍、█ 倍) の用量で投与した非臨床試験 (非 GLP 試験) において、BDD-hFVIII 発現量は投与後 ██████████ にピークを示し、その時点での低用量、中用量、高用量群での平均発現量はそれぞれ正常抗原量 (150 ng/mL) の ██████████ ± ██████████%、██████████ ± ██████████%、██████████ ± ██████████%であった。すべての投与群において、本遺伝子組換え生物等の投与及び BDD-hFVIII 過剰発現に関連する有害事象は認められなかった。

カニクイザルに本遺伝子組換え生物等を ██████████ ██████████ (第 III 相臨床試験の予定される最大用量 ██████████ のそれぞれ █ 倍、█ 倍、█ 倍) の用量で投与した非臨床試験 (GLP 試験) において、BDD-hFVIII 発現量は投与後 ██████████ にピークを示し、その時点での低用量、中用量、高用量群での平均発現量はそれぞれ正常抗原量 (150 ng/mL) の ██████████ ± ██████████%、██████████ ± ██████████%、██████████ ± ██████████%であった。すべての投与群において本遺伝子組換え生物等の投与及び BDD-hFVIII 発現に関連した有害事象は認められなかった。

本遺伝子組換え生物等と同じ BDD-hFVIII を発現する類似の組換え AAV を免疫不全雄性マウス (NOD/SCID) に ██████████ ██████████ (第 III 相臨床試験の予定される最大用量 ██████████ のそれぞれ █ 倍、█ 倍、█ 倍) の用量で投与した非臨床試験 (GLP 試験) において血中 hFVIII 抗原は ██████████ 間にわたって用量依存的に発

現した。投与後 ■■■ における各群の平均発現量は、それぞれ正常抗原量（150 ng/mL）の ■■%、■■%、■■%であった。また、投与後 ■ 日における平均発現量は、最も高い群で ■■%であった。この非臨床試験においてみられた最も高い血中 hFVIII 抗原量は正常抗原量の ■■%であった。すべての投与群において、本遺伝子組換え生物等類似の組換え AAV の投与及び BDD-hFVIII 過剰発現に関連する有害事象は認められなかった。

### (3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した本遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ増殖が起こりうるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAV が発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうる rcAAV は、将来的に原薬又は製剤の規格試験で規格値を定めて管理する。

したがって、本遺伝子組換え生物等が発現する BDD-hFVIII が第三者、野生動植物等に対して有害作用を示す可能性は極めて小さいと考えられる。

### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、有害物質の産生性に起因した生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

文献 28 : Mingozi, F., & High, K. A. (2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(1), 23-36.

文献 29 : Muhuri, M., Maeda, Y., Ma, H., Ram, S., Fitzgerald, K. A., Tai, P. W., & Gao, G. (2021).  
Overcoming innate immune barriers that impede AAV gene therapy vectors. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(1).

文献 30 : Refacto AF, INN-moroctocog alfa, Product Information  
([https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/refacto-af-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/refacto-af-epar-product-information_en.pdf))

#### 4. 核酸を水平伝達する性質

##### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物又は他の微生物の特定

野生型 AAV はヒトを自然宿主とし、自然界では、ヒト、サル等の哺乳動物が影響を受ける可能性がある。本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失、供与核酸の導入、並びに AAV3B に由来する改変型キャプシドの他は野生型 AAV と本質的に同一である。これらの改変による野生型 AAV からの感染宿主域の変化はない。

##### (2) 影響の具体的内容の評価

野生型 AAV は低い確率で感染細胞のゲノムに挿入されることが知られている。

一方、本遺伝子組換え生物等が感染したヒト又はヒト以外の哺乳類で一過性に *coBDD-hFVIII<sup>ΔQ</sup>* 遺伝子を発現する可能性はあるが、これによる他の哺乳類個体への核酸の水平伝達は知られていない。

また、AAV 粒子へパッケージング可能なゲノムサイズを考慮すると、rcAAV は野生型 AAV と同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAV が核酸を水平伝達する性質はないと考えられる。

##### (3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等が環境中へ拡散する可能性は低く、拡散したとしても極めて微量である。本遺伝子組換え生物等は *rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失により増殖能力がないため、本遺伝子組換え生物等由来の核酸が感染細胞のゲノムに組み込まれる可能性は

極めて低い。

また、本遺伝子組換え生物等は、ヘルパーウイルスと共感染しても増殖することはない、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスが三重感染した場合のみ水平感染が発生する可能性があるが、その可能性は極めて低い。さらに、rcAAV が発生した場合であっても、環境中で増殖するためには、ヘルパーウイルスとの共感染が必要であるため、その可能性は極めて低い。

製造工程で生じうる rcAAV は、将来的に原薬又は製剤の規格試験で規格値を定めて管理する。

したがって、本遺伝子組換え生物等及び rcAAV が、第三者、野生動植物等に対して核酸を水平伝達する可能性は極めて低いと考えられる。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

第一種使用規程承認申請書に記載された遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、核酸を水平伝達する性質に基づいて、生物多様性の影響が生ずるおそれはないと判断される。

#### 5. その他の性質

野生型 AAV については、トランスポゾンやプラスミド等の可動性遺伝因子 (mobile genetic elements) は知られておらず、当該第一種使用等によってそれらを介した遺伝子の伝播が起こることはないと考えられる。

## V 総合的評価

本遺伝子組換え生物等が感染する動植物等の種類は野生型 AAV と同等で、哺乳動物に感染する。自然界で植物及び微生物に感染するとの報告はない。

第一種使用規程申請書に記載した本遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしても、極めて微量である。

本遺伝子組換え生物等は、*rep* 及び *cap* 遺伝子の欠失及び供与核酸の導入、並びに AAV3B に由来する改変型キャプシドの他は野生型 AAV と本質的に同一である。これらの改変による野生型 AAV からの感染宿主域の変化はない。

本遺伝子組換え生物等による *coBDD-hFVIII<sup>90</sup>* 遺伝子の発現はヒト及び他の哺乳動物に病原性、有害物質の産生性及び核酸を水平伝達する性質をもたないことから、生物多様性への影響はないと考えられる。また、本遺伝子組換え生物等は増殖能を失っているため、野生型 AAV 及びヘルパーウイルスと三重感染しないかぎり、環境中で増殖することはなく、その可能性は極めて低い。ヒト体内の同一の細胞に本遺伝子組換え生物等と野生型 AAV 及びそのヘルパーウイルスが感染する可能性は極めて低く、本遺伝子組換え生物等はやがて環境中から消滅すると考えられる。

本遺伝子組換え生物等を製造する過程で本遺伝子組換え生物等に由来する rcAAV が生じる可能性は否定できないが、rcAAV は AAV のウイルス粒子にパッケージ可能なゲノムサイズを考慮すればほぼ全ての供与核酸を失っている可能性が高く、rcAAV は野生型 AAV と同一又は極めて近い構造になると考えられるため、rcAAV が病原性、有害物質の産生性及び核酸を水平伝達する性質によりヒト及び他の哺乳動物等に影響を与えることはないと考えられる。さらに、この rcAAV も野生型 AAV と同様にヘルパーウイルスの共存がないかぎり実際には増殖することは不可能である。

したがって、第一種使用規程承認申請書に記載した本遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、本遺伝子組換え生物等による生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。